Теппоне Михаил

Основные этапы развития генной инженерии вирусов

Bionion SDN. BHD. N 1, Jalan Sungai Jeluh 32/192, Shah Alam, 40460, Selangor, Malaysia

[Перевод статьи - Teppone M. History of advances in genetic engineering of viruses
before COVID-19 pandemic. – Surg Neurol Int. 2023 Mar 24;14:109. doi: 10.25259/SNI]

*Сенат США предполагает, что пандемию вызвало
"скорее всего" происшествие в лаборатории.*
[Москва, ТАСС, 26 ноября 2022]

*Спикер Государственной Думы Вячеслав Володин
считает,что США обязаны компенсировать мировым
странам издержки от последствий пандемии коронавируса*
[Москва, ТАСС, 28.10.22]

Краткое содержание

Проведен обзор основных этапов развития генной инженерии вирусов.

Появление первых генетически модифицированных вирусов стало возможным с середины 1950-х годов. В первоначальных исследованиях вирусы обрабатывались различными физическими или химическими факторами, а затем проводилась их селекция в зависимости от ослабления или усиления патогенных функций.

В конце 1970-х годов была разработана методика управляемого изменения генома вируса, получившая название «метод обратной генетики». В 1980-х появилась возможность комбинировать гены различных вирусов и осуществлять вставки генов одних вирусов, в геномы других вирусов. С этого времени началось производство векторных вакцин.

Технологии сегодняшнего дня дают возможность собрать любой полноразмерный вирус на основании последовательности нуклеотидов имеющихся в базе данных, или создать новый искусственный вирус на основании виртуальной модели, рассчитанной компьютером.

Ключевые слова: генная инженерия; обратная генетика; реассортный вирус; рекомбинантный вирус, химерный вирус; SARS-CoV-2, COVID-19.

Mikhail Teppone

The main historical stages in the development of genetic engineering of viruses.

Abstract: There is a brief review of the development of genetic engineering of viruses.

The emergence of the first genetically modified viruses has been possible since the middle of the 1950s. In the ongoing studies, natural viruses were treated with various physical or chemical agents, and then they were selected depending on the weakening or strengthening of the viral virulence.

In the late 1970s, a method of controlled genome modifying of the virus was developed, called the "reverse genetics" method. Then it became possible to combine the genes of different viruses and insert the genes of one virus into the genome of another virus. Since that time, the production of vector vaccines has begun.

Nowadays there is a technology for assembling any virus based on the nucleotide sequence description which is available in the database, or creating a new artificial virus based on a virtual model proposed by a computer.

Для корреспонденции: Михаил Теппоне, медицинский директор, Bionion SDN. BHD. Berhad, e-mail: mikhail.teppone@gmail.com

Предпосылки

31 декабря 2019 года, местное отделение Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) в Китае было предупреждено о случаях пневмонии неизвестного происхождения, выявленных в городе Ухань.[1]

Введение

21 января 2020 в Твиттере появилось сообщение Джордана Сазера, который сообщил о том, что коронавирус, вызвавший эпидемию в Китае, был запатентован еще в 2018 году. Сазер также напомнил, что в начале 2019 года, ВОЗ назвала недоверие к вакцинам (*vaccine hesitancy*) одной из десяти главных угроз для глобального здравоохранения. Далее Дж. Сазер задает вопросы, было ли новое заболевание запланированным, будет ли оно способом для получения денег через систему Big Pharma, используются ли средства массовой информации (СМИ) для нагнетания страха вокруг нового заболевания, и др.[2]

С этого времени в некоторых СМИ началось обсуждение темы происхождения нового вируса, включая предположение об утечке вируса из био-лаборатории или запуск пандемии с целью проведения глобальной вакцинации.

31 января 2020 года был опубликован препринт – «Уникальные вставки в шиповидный белок 2019-nCoV»,[3] а затем появилась статья – «Уменьшение и функциональное истощение Т-клеток у пациентов с COVID-19».[4] Эти исследования указывали на структурное и функциональное сходство между двумя вирусами, что дало объективное основание для обсуждения темы об искусственном происхождении SARS-CoV-2.

5 февраля 2020 года, сайт ВЕСТИ.RU опубликовал краткий обзор исследований по созданию искусственных и генетически модифицированных вирусов за последние двадцать лет. Среди них были: вирус мышиной оспы, синтезированный в Австралии (2001); вирус полиомиелита, синтезированный в США (2002); восстановленный, а затем модифицированный вирус гриппа «испанка», с которым работали ученые из США и Японии (2005-2008); вирус птичьего гриппа, передающийся воздушно-капельным путем, был синтезирован в Нидерландах (2011); рекомбинантный[1] коронавирус, представляющий эпидемическую опасность для людей, был создан учеными из США, Китая и Швейцарии (2015); вирус оспы лошадей был воссоздан учеными из Канады и США (2018), и др.[5]

Подтверждением возможности получения нового вируса искусственным путем было создание синтетического коронавируса в швейцарской лаборатории в феврале 2020 года. Для синтеза ученые использовали описание генома, опубликованного китайскими авторами.[6]

Версию искусственного происхождения SARS-CoV-2 поддержал один из нобелевских лауреатов по физиологии и медицине за 2003 год, Лук Монтанье, хорошо знакомый с достижениями современной вирусологии. По мнению эксперта, новый вирус стал побочным эффектом исследований по созданию вакцины, для профилактики ВИЧ инфекции.[7] Предположительно, несколько генов, важных для формирования иммунитета против ВИЧ, были вставлены в геном коронавируса. Оставалось лишь добиться ослабления вирулентности нового вируса и векторная вакцина против ВИЧ инфекции была бы готова.

Сторонники естественного происхождения нового вируса были в большинстве. Среди них можно встретить немало российских и зарубежных экспертов, утверждающих, что создание в лаборатории вируса, подобного SARS-CoV-2, было невозможно.

[1] Термины «рекомбинантный», «реассортный», «гибридный» и «химерный» - используются как близкие по смыслу, для описания нового вируса, состоящего из генов, принадлежащих к различным вирусам (прим. автора)

В марте 2020 года, группа ученых, насчитывающая около 30 человек, опубликовала статью в журнале Ланцет (*Lancet*), в которой было написано следующее: «Мы вместе решительно осуждаем все теории заговора, предполагающие, что COVID-19 не имеет естественного происхождения. Ученые из многих стран опубликовали и проанализировали геномы возбудителя тяжелого острого респираторного синдрома коронавируса SARS-CoV-2, и они в подавляющем большинстве приходят к выводу, что этот коронавирус возник в дикой природе».[8]

18 апреля 2020 года, глава Уханьского института вирусологии АН КНР, Юань Чжимин, заявил, что характеристики нового коронавируса указывают на то, что он не мог быть создан в лаборатории, поскольку у человечества пока еще нет достаточных знаний для такого проекта.[9]

Подробный и взвешенный анализ возможных вариантов происхождения нового вируса был опубликован в июле 2020 года. В этом исследовании Алехандро Соуза приходит к заключению, что, отдельные генетические особенности, обнаруженные у SARS-CoV-2, можно объяснить, как произошедшие естественным образом. Тем не менее, поскольку они собраны в одном вирусе, то по мере увеличения числа имеющихся аномалий, вызывающих усиление патогенных функции, вероятность возникновения такого вируса в природе минимальна.[10]

Задачей данного исследования является изучение основных этапов развития технологий, позволяющих модифицировать природные вирусы и создавать новые, имевших место до начала пандемии COVID-19.

1. Начало исследований по модифицированию вирусов

После выделения вируса табачной мозаики (1935) началось изучение строения вирусов, а также определение роли вирусных белков и нуклеиновых кислот в инфекционном процессе.

Регулярные исследования по расщеплению и воссозданию вирусов начали проводиться с середины 1950-х годов. В фундаментальном труде, изданном в 1959 году и озаглавленном «Вирусы», в разделе, посвященном инфекционности вирусов, имеются следующие главы: *Формирование вирусов из разных штаммов*; *Смешивание нуклеиновых кислот различных вирусов*; *Смешанные вирусы*; *Производство вирусов-мутантов in vitro*, и пр. В частности, на стр. 453 можно прочитать следующее: «Поскольку стало возможным продемонстрировать инфекционность деградированных и реконструированных вирусных препаратов, наша цель состояла в том, чтобы произвести по желанию новые генетические, то есть реплицирующиеся, виды молекул».[11]

Вирусы подвергались воздействию различных физических и химических факторов, что приводило к изменению их генотипа и фенотипа. Важным аспектом таких исследований было выделение и изучение частей вирусного генома, которые играли ведущую роль в процессе инфицирования и развития болезни.[12] Работы по созданию особо патогенных вирусов с помощью адаптивного воздействия продолжаются и в наше время.[13]

2. Новые технологии, разработанные для изменения и синтеза нуклеиновых кислот и точного анализа последовательности нуклеотидов

Методика гибридизация нуклеиновых кислот была разработана к середине 1960-х годов.[14] В конце 1960-х появилась возможность вставлять фрагменты ДНК вирусов в молекулы ДНК клеток животных.[15] Затем была разработана технология соединения концов молекул ДНК, принадлежащих к различным вирусам и бактериям, и были сконструированы кольцевые структуры, состоящие из ДНК обезьяньего вируса 40 (SV40), сегмента ДНК гена фага лямбда, и сегмента ДНК бактерии *E.Coli*.[16] Примерно в это же время проводились эксперименты по внеклеточному синтезу молекул нуклеиновых кислот.[17] В 1976 году был создан гибридный вирус, в котором сегмент молекулы ДНК фага лямбда был помещен на место удаленной части ДНК генома SV40.[18]

К 1978 году была разработана методика управляемого изменения генома вируса, получившая название «метод обратной генетики». Молекулу РНК, которую нужно воспроизвести, использовали в качестве матрицы, на которой, с помощью фермента обратной транскриптазы, строилась молекула ДНК. Затем, вновь созданная молекула ДНК использовалась в качестве матрицы для построения молекул РНК, идентичных первичной экспериментальной молекуле. На этом этапе синтеза использовался фермент ДНК зависимая РНК-полимераза.[19]

В 2002 году, в Государственном университете Нью-Йорка, из синтетических олигонуклеотидов был собран шаблон в виде молекулы ДНК, а затем был получен полноразмерный инфекционный нейровирулентный полиовирус, способный парализовать и убивать мышей. Последовательность нуклеотидов вирусного генома была взята из базы данных, имеющейся в Интернете, а необходимые синтетические олигонуклеотиды были куплены через сеть продажи химических веществ. В этом эксперименте была доказана возможность синтезировать инфекционный агент химико-биохимическими средствами *in vitro*, имея лишь описание генома и синтетические нуклеотиды.[20]

В 2003 было сделано сообщение о новой методике, позволяющей осуществлять быструю сборку синтетической молекулы ДНК размером от 5 до 6 Кбайт. В качестве подтверждения этого был собран полный инфекционный геном бактериофага X174, состоящий из 5386 нуклеотидов, для чего использовались химически синтезированные олигонуклеотиды. Инфекционность синтетической ДНК была ниже, чем природной ДНК, что указывало на наличие примерно 10 ошибок на всю молекулу.[21]

Создание новых бактериальных и вирусных геномов сопровождалось появлением методов определения последовательности нуклеотидов, т.е. секвенирования молекул ДНК и РНК.[22-24]

3. Создание реассортных вирусов и векторных вакцин

К началу 1980-х годов генная инженерия разработала технологию, позволяющую вставлять выбранный ген в необходимую позицию генома, а затем анализировать фенотип нового объекта исследований. В 1982 году были опубликованы результаты работ по созданию и изучению свойств реассортных поксвирусов, в первичный геном которых были вставлены гены простого герпеса. Деннис Паникали и соавт. сообщили: «Мы сконструировали рекомбинантные вирусы коровьей оспы, содержащие ген тимидинкиназы, взятого из вируса простого герпеса». В первом случае, ген вируса герпеса был вставлен в геном вируса коровьей оспы, подвергшегося спонтанной делеции, а во втором – ген вируса герпеса был вставлен в геном штамма вируса прототипа коровьей оспы размером 120 мегадальтон.[25]

Вновь создаваемые реассортные вирусы стали активно использоваться для производства вакцин. Так, например, Энцо Паолетти и соавт. опубликовали статью, в которой написано следующее: "Описываемый метод включает перенос определенного гена из инфекционного агента в генетический материал вируса вакцины против оспы. Этот уникальный чужеродный ген, был выбран потому, что он содержит информацию, необходимую для синтеза антигена, важного для иммунитета к возбудителю этого инфекционного заболевания; теперь он экспрессируется под контролем сконструированного вируса вакцины против оспы. При иммунизации этой живой рекомбинантной вакциной организм вводится в заблуждение, думая, что он был инфицирован чужеродным инфекционным агентом, и предпринимает защитную атаку, приводящую к невосприимчивости к этому конкретному инфекционному агенту». Далее сообщается, что вакцинные вирусы оспы были сконструированы так, чтобы экспрессировать гены, кодирующие поверхностный антиген вируса гепатита В, гликопротеин D вируса простого герпеса и гемагглютинин вируса гриппа.[26] Таким образом, новый реассортный вирус включал гены четырех типов вируса, а именно – оспы, герпеса, гриппа и гепатита. Это исследование было завершено и опубликовано в сентябре 1984 года.

Вакцина, изготовленная на основании генетически модифицированного неифекционного вируса, в геном которого вставлены гены, взятые от инфекционного вируса, против которого направлено профилактическое действие, получила название «векторная вакцина».[27]

Таким образом, наличие любой векторной вакцины подразумевает изготовление нового генетически модифицированного реассортного вируса. Можно предположить, что создание вируса, аналогичного SARS-CoV-2, стало возможным не позднее конца 1980-х или начала 1990-х годов.

4. Возрождение вируса, вызвавшего пандемию гриппа в 1918-1920 годах

В 1995 году группа экспертов из Института патологии вооруженных сил США начала исследования по выделению вируса, который вызвал пандемию гриппа «испанка». В 2005 году ученые пришли к выводу, что это был птичий не-реассортный вирус, который адаптировался к людям.[28] Вирус гриппа «испанка» был воспроизведен с помощью метода обратной генетики, и после проведения завершающих манипуляций смертоносный вирус стал специфическим для человека.[29]

В ходе исследования отдельных частей вируса «испанки» были выявлены участки генома, которые могли быть ответственными за высокую вирулентность и смертность. Затем началось создание новых реассортных вирусов, а также проверка их вирулентности. В частности, были созданы рекомбинантные вирусы, в которых гены вируса 1918 года были заменены генами современного вируса гриппа человека H1N1, а также рекомбинантные вирусы, в которых гены современного вируса гриппа человека были заменены генами вируса 1918 года.[30-31] Предполагалось, что понимание факторов вирулентности будущих пандемических вирусов поможет создать эффективные противовирусные препараты, способные остановить будущую пандемию.

5. Продолжение работ по созданию реассортных вирусов

Работы с потенциально опасными вирусами включали исследования по изменению генотипа и фенотипа среди реовирусов,[32] флавивирусов,[33] поксвирусов,[34] ортомиксовирусов,[35] коронавирусов,[36] и др.

Одной из особенностей эпидемического ротавирусы, вызывающего диарею у человека, является затрудненное культивирование на питательной среде. После заменены нескольких генов, которые ограничивали рост, генами культивируемого ротавируса крупного рогатого скота, был получен реассортный человеческий ротавирус, способный расти в тканевой культуре.[32]

В 1999 году ученые создали реассортный флавивирус, у которого гены, кодирующие два структурных белка вируса японского энцефалита, были вставлены в геном вируса желтой лихорадки. Новые вирусы росли в клетках позвоночных или комаров также хорошо, как и их предшественники, хотя они не имели общих комаров-переносчиков и резервуаров среди позвоночных, и отличались по вызываемым ими клиническим синдромам.[33]

В 2001 году был получен реассортный вирус оспы мышей, в геном которого был вставлен ген вируса простого герпеса. У генетически устойчивых мышей, зараженных модифицированным вирусом, наблюдалось усиление выработки интерлейкина-4 и подавление цитолитического ответа естественных киллеров и цитотоксических Т-лимфоцитов. Молниеносное развитие заболевания и смерть животных от мышиной оспы наступала даже в случае проведения предварительной вакцинации.[34]

Исследования по созданию реассортных вирусов гриппа не ограничились работами с «испанкой», но распространились и на другие штаммы. В частности, в одной из публикаций за 2008 год сообщается: «мы использовали обратную генетику для создания 63 вирусных реассортантов, полученных из вирусов H5N1 и H3N2, содержащих гены поверхностных

белков H5N1». 13 из 63 реассортантов представляли наибольшую угрозу для хозяев-млекопитающих. А один из наиболее патогенных реассортантов содержал внутренний ген полимеразы B1 птичиего гриппа и напоминал пандемические вирусы 1957 и 1968 годов.[35]

В сентябре 2011 года, на Мальте, состоялась 4-я конференция Европейской научной рабочей группы по гриппу (ESWI), на которой был представлен ряд докладов, описывающих создание генетически модифицированных вирусов, с усиленными или ослабленными патогенными функциями.

Один из докладов был озаглавлен: «Почему высокопатогенный вирус птичьего гриппа (HPAI) H5N1 не передается воздушно-капельным путем? Обширный мутационный и фенотипический анализ мутантных и реассортантных вирусов H5N1». В разделе *Методы* сообщается: «Мы ввели несколько известных адаптационных мутаций и заменили несколько генных сегментов в попытке адаптировать вирус HPAI H5N1 для эффективной репликации и возможной передачи среди млекопитающих животных».[37]

Другой доклад конференции был посвящен созданию *in vitro* реассортных вирусов устойчивых к препарату осельтамивиру (тамифлю). Для этого в культуре клеток почки собаки формировали комбинированную инфекцию, смешивая в разных пропорциях вирусы гриппа, как устойчивые, так и чувствительные к осельтамивиру.[38]

На конференции были представлены результаты экспериментов на животных, при которых произошло спонтанное смешивание между вирусами дикого типа гриппа и живыми вирусами ослабленного штамма, используемого для вакцины. Как оказалось, новые реассортанты не стали более опасными, чем родители дикого типа.[39] Сообщалось также о том, что у одного из пациентов был обнаружен реассортный вирус, включавший гены сезонного и пандемического вирусов гриппа, однако природные реассортанты не представляли пандемической опасности.[40]

Можно предположить, что появление в природе реассортных вирусов, которые представляли бы пандемическую опасность, маловероятно. А в случае их образования наступает гибель хозяина, в теле которого произошла гибридизация.

В исследованиях, опубликованных в 2015 году, ученые из США, Китая и Швейцарии изучали направления возможных мутаций коронавируса летучих мышей, при которых относительно безопасный вирус приобрел бы новые свойства и был бы способен вызвать пандемию среди людей. С помощью метода обратной генетики, в геном вируса SARS-CoV был введен ген, экспрессирующий шип коронавируса летучих мышей SHC014. У реассортного вируса появилась возможность эффективно соединяться с ангиотензинпревращающим ферментом 2 (ACE2) – рецептором, находящемся на мембране клеток различных тканей человека, а также размножаться в клетках дыхательных путей и достигать *in vitro* титров, эквивалентных эпидемическим штаммам SARS-CoV. Кроме того, была выявлена резистентность вируса к лечебным и профилактическим средствам, использовавшимся для лечения атипичной пневмонии. На основании проведенных исследований, авторы высказали опасение, что коронавирус может быть причиной будущей пандемии.[36]

В 2018 году, канадские и американские ученые смогли воссоздать вирус оспы лошадей. В связи с тем, что синтез вируса оспы затруднен из-за его больших размеров, поэтому сначала синтезировали десять больших фрагментов ДНК по 10-30 Кбайт каждый, и лишь затем их собрали вместе, убирая избыточные участки. Синтезированный вирус проявлял меньшую вирулентность у мышей, чем вирус коровьей оспы, тем не менее, он обеспечивал вакцинную защиту от летального заражения натуральным вирусом.[41]

В одной из статей, опубликованных в 2022 году, сообщается о создании рекомбинантного SARS-CoV-2, в котором ген, кодирующий шиповой белок варианта вируса *Omicron*, был вставлен в геном первоначального вируса SARS-CoV-2. Новый вирус, в эксперименте, вызвал тяжелое заболевание у мышей с уровнем смертности до 80%.[42]

6. Ограничения, вводимые на исследования, направленные на усиление патогенных функций вирусов

Ряд научных сообщений, представленных на конференции, состоявшейся на Мальте в сентябре 2011 года, вызвал бурную дискуссию, как среди ученых, так и среди журналистов. 20 декабря 2011 года представитель Национального научного консультативного совета по биобезопасности США (NSABB) заявил, что впредь рекомендуется публиковать только окончательные результаты экспериментов и выводы, без подробного описания процесса, используемого при создании новых опасных вирусов.[43]

17 октября 2014 года, в связи с нарастающей угрозой появления в окружающей среде новых опасных вирусов, исследования по усилению патогенных функций вирусов на территории США были временно приостановлены.[44] Однако 9 января 2017 года этот запрет был снят. В комментариях к указу было написано: «Принятие этих рекомендаций удовлетворит требованиям по снятию действующего моратория на определенные исследования в области науки о жизни, которые могут повысить вирулентность и/или трансмиссивность патогена с целью создания потенциального пандемического патогена».[45]

7. Случаи утечки опасных патогенов из био-лабораторий

Несмотря на многочисленные заявления о том, что исследования по модификации вирусов проводятся в лабораториях, имеющих высокую степень безопасности, тем не менее, известны случаи нарушения правил хранения и транспортировки опасных вирусов за пределы лабораторий. Приведем лишь несколько примеров.

5 августа 2019 года в газете Нью Йорк Таймс была опубликована статья, которая называлась: «Исследования смертоносных микробов в армейской лаборатории прекращены из-за соображений безопасности». В лаборатории, базирующейся в Форте-Детрик, штат Мэриленд, находилось около 70 особо опасных патогенов и токсинов, включая вирусы лихорадки Эбола и натуральной оспы, бактерии сибирской язвы и чумы, а также яд рицин. Причиной закрытия лаборатории была проблемы с утилизацией опасных материалов. Исследования в лаборатории в Форт-Детрик уже были приостановлены в 2009 году, что было вызвано обнаружением образцов опасных патогенов, не занесенных в базу данных.[46]

Другой, не менее опасный случай произошел в январе 2009 года, когда австрийская фармацевтическая компания Бакстер отправила емкости с «вакциной» против гриппа (H3N2) в биологические лаборатории Германии, Чехии и Словении. После введения «вакцины» хорькам, некоторые животные погибли. При проверке оказалось, что «вакцины» содержала живой вирус птичьего гриппа (H5N1). В первом объяснении относительно произошедшего инцидента, сотрудники компании Бакстер заявили, что вакцины были заражены опасным вирусом случайно, вероятно, во время упаковки. В дальнейшем, представитель компании Бакстер признался, что вместо вакцин они отправили «экспериментальный вирусный материал», однако это не было отражено в сопроводительных документах.[47]

В 2005 году более 1000 лабораторий, располагающихся на территории США, получили тестовые наборы, включавшие ампулы с живым вирусом гриппа (H2N2), бывшим причиной пандемии в 1957 году. При этом сотрудники лабораторий не были проинформированы о возможности присутствия опасного вируса в наборах, отправленных для проверки квалификации этих лабораторий.[47]

Заключение

Проведенный обзор позволяет предположить, что появление новых генетически модифицированных вирусов стало возможным не позднее середины 1950-х годов. В проводившихся исследованиях природные вирусы обрабатывались различными физическими или химичес-

кими агентами, а затем проводилась их селекция в зависимости от ослабления или усиления патогенных функций вируса. Как известно, первая пандемия, вызванная реассортным вирусом, включающим гены птичьего и человеческого вирусов гриппа (H2N2), произошла в 1957-1958 годах.[48]

В дальнейшем появилась возможность комбинировать гены различных вирусов и осуществлять вставки генов одних вирусов, в геномы других вирусов. С этого времени началось производство векторных вакцин для которых используются генетически модифицированные реассортные вирусы. К этому же времени относится и появление возможности создания вируса, аналогичного SARS-CoV-2. Вероятно, первый реассортный вирус, включавший гены четырех типов вируса одновременно, был обнаружен в природе во время пандемии «свинного гриппа», начавшейся весной 2009 года.[49]

В настоящее время имеются все необходимые предпосылки для сборки любого полноразмерного вируса на основании последовательности нуклеотидов имеющихся в вирусной базе данных, или для создания нового искусственного вируса на основании виртуальной модели, рассчитанной компьютером.

Таким образом, к началу 2019 года возможности генной инженерии вирусов были более совершенными, чем необходимо для создания вируса, вызвавшего пандемию COVID-19. Исходя из этого, ученым всего мира следует поддержать Нила Харрисона и Джеффри Сакса из Колумбийского Университета (США), призывавших провести тщательное и независимое расследование происхождения SARS-CoV-2, поскольку этот вопрос все еще не решен.[50]

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов в представленной рукописи.

Литература

1. Pneumonia of unknown cause – WHO, China, January 5, 2020; https://www.who.int/csr/don/05-january-2020-pneumonia-of-unkown-cause-china/en/
2. Sather J. The new fad disease called the “coronavirus” is sweeping headlines. – Twitter, January 21, 2020; https://web.archive. org/web/20200122014724/https://twitter.com/Jordan_Sather_/status/1219795721286586368
3. Pradhan P, Pandey AK, Mishra A, et al. Uncanny similarity of unique inserts in the 2019-nCoV spike protein to HIV-1 gp120 and Gag. *bioRxiv*, posted January 31, 2020; withdrawn on February 2, 2020; doi:10.1101/2020.01.30.927871;https://web.archive.org/web/20200131211006/https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.01.30.927871v1.full.pdf
4. Diao B, Wang CH, Tan YJ, et al. Reduction and Functional Exhaustion of T-Cells in Patients with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Front Immunol* 2020 May 1;11:827. doi: 10.3389/fimmu.2020.00827 *medRxiv* 2020.02.18.20024364; doi: https://doi.org/10.1101/2020.02.18.20024364;
5. Семь смертельно опасных вирусов, созданных в лаборатории. – ВЕСТИ.RU, 5 февраля 2020: https://www.vesti.ru/finance/article/1291582
6. Thi Nhu Thao T, Labroussaa F, Ebert N. et al. Rapid reconstruction of SARS-CoV-2 using a synthetic genomics platform. *bioRxiv* 2020.02.21.959817; doi: https://doi.org/10.1101/2020.02.21.959817
7. Le professeur Luc Montagnier a expliqué qu'il ne croit pas que le Covid-19 provienne d'une contamination dans un marché aux animaux sauvages de Wuhan. – Coronavirus: les 5 infos essentielles de ce vendredi 17 avril 2020; [цит. 20.11.22], доступно на сайте: https://www.cnews.fr/france/2020-04-17/coronavirus-les-5-infos-essentielles-de-ce-vendredi-17-avril-948002
8. Calisher C, Carroll D, Colwell R, et al. Statement in support of the scientists, public health professionals, and medical professionals of China combatting COVID-19. *Lancet* 2020 Mar 7; 395(10226): e42-e43. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30418-9.

9. Coronavirus Pandemic: Wuhan Virology Institute denies reports it manufactured virus. – CGTN, April 18, 2020; https://news.cgtn.com/news/326b7a4e78514464776c6d636a4e6e62684a4856/index.html

10. Sousa A. SARS-Cov-2 Natural or Artificial? That is the Question. – *Clin Microbiol Res* 2020 Jul, 3(1): 6-12; DOI: 10.31487/j.CMR.2020.01.06

11. Fraenkel-Conrat H. The chemical basis of the infectivity of tobacco mosaic virus and other plant viruses. – (Ed.) Burnet FM, Stanley WM. The Viruses. Biochemical, Biological, and Biophysical Properties. General Virology. Vol. 1. – New York, London: Academic Press, 1959: 429-57.

12. Sergueiev VA, Driagaline NN, Cnoufriev VP, Sielsieukine AA. Etude des variantes modifiées du virus aphteux. – *Off. Intern. des Épizooties, Bull* 1969 Jan-Fév, 71(1-2): 155-165.

13. Lowen A, Palese P, Steel J. Adaptation of low pathogenic avian influenza viruses to a high growth phenotype in primary human tracheo-bronchial epithelial cells. – The Fourth ESWI Influenza Conference, 11-14 September 2011, Malta: Abstract book. – Malta: ESWI, 2011: 122.

14. Sinsheimer RL, Lawrence M. In vtro synthesis and properties of a phi-X DNA-RNA hybrid. *J Mol Biol* 1964 Feb;8:289-96. doi: 10.1016/s0022-2836(64)80138-8. PMID: 14126297.

15. Sambrook J, Westphal H, Srinivasan PR, Dulbecco R. The integrated state of viral DNA in SV40-transformed cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1968 Aug;60(4):1288–1295.

16. Jackson DA, Symons RH, Berg P. Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of Simian Virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci USA* 1972 Oct;69(10):2904-9. doi: 10.1073/pnas.69.10.2904.

17. Kacian DL, Mills DR, Kramer FR, Spiegelman S. A replicating RNA molecule suitable for a detailed analysis of extracellular evolution and replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 1972 Oct;69(10):3038-42. doi: 10.1073/pnas.69.10.3038.

18. Goff SP, Berg P. Construction of hybrid viruses containing SV40 and lambda phage DNA segments and their propagation in cultured monkey cells. *Cell* 1976 Dec;9(4 PT 2):695-705. doi: 10.1016/0092-8674(76)90133-1.

19. Taniguchi T, Palmieri M, Weissmann C. QB DNA-containing hybrid plasmids giving rise to QB phage formation in the bacterial host. *Nature* 1978 Jul 20; 274 (5668): 223-8. doi: 10.1038/274223a0.

20. Cello J, Paul AV, Wimmer E. Chemical synthesis of poliovirus cDNA: generation of infectious virus in the absence of natural template. *Science* 2002 Aug 9;297(5583): 1016-8. doi: 10.1126/science.1072266.

21. Smith HO, Hutchison CA 3rd, Pfannkoch C, Venter JC. Generating a synthetic genome by whole genome assembly: phiX174 bacteriophage from synthetic oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003 Dec 23;100(26):15440-5. doi: 10.1073/pnas.2237126100.

22. Brimacombe R, Trupin J, Nirenberg M, Leder P, Bernfield M, Jaouni T. RNA codewords and protein synthesis, 8. Nucleotide sequences of synonym codons for arginine, valine, cysteine, and alanine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1965 Sep;54(3):954-60. doi: 10.1073/pnas.54.3.954.

23. Mills DR, Kramer FR, Spiegelman S. Complete nucleotide sequence of a replicating RNA molecule. *Science* 1973 Jun 1; 180 (4089): 916-927. doi: 10.1126/science.180.4089.916

24. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977 Dec;74(12):5463-7. doi: 10.1073/pnas.74.12.5463.

25. Panicali D, Paoletti E. Construction of poxviruses as cloning vectors: insertion of the thymidine kinase gene from herpes simplex virus into the DNA of infectious vaccinia virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982 Aug; 79(16):4927-31. doi: 10.1073/pnas.79.16.4927.

26. Paoletti E, Weinberg RL, Davis SW, Davis M. Genetically engineered poxviruses: a novel approach to the construction of live vaccines. *Vaccine* 1984 Sep;2(3): 204-8. doi: 10.1016/0264-410x(84)90086-0.

27. Hashizume S, Morita M, Takahashi F. [New technology of vaccine production –international prospect of the development. Method and theory of production of vaccines by genetic engineering. a. Vaccinia vector vaccine]. *Nihon Rinsho* 1987 Oct;45(10):2333-41. PMID: 3482288 [Japanese]

28. Taubenberger JK, Reid AH, Lourens RM, et al. Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes. *Nature* 2005 Oct 6;437(7060):889-93. doi: 10.1038/nature04230.

29. Tumpey TM, Baster CF, Aguilar PV, et al. Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus. *Science* 2005 Oct 7;310(5745):77-80. doi: 10.1126/science.1119392.

30. Pappas C, Aguilar PV, Basler CF, et al. Single gene reassortants identify a critical role for PB1, HA, and NA in the high virulence of the 1918 pandemic influenza virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008 Feb 26;105(8):3064-9. doi: 10.1073/pnas.0711815105.

31. Watanabe T, Watanabe S, Shinya K, et al. Viral RNA polymerase complex promotes optimal growth of 1918 virus in the lower respiratory tract of ferrets. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009 Jan 13;106(2):588-92. doi: 10.1073/pnas.0806959106.

32. Greenberg HB, Kalica AR, Wyatt RG, Jones RW, Kapikian AZ, Chanock RM. Rescue of noncultivatable human rotavirus by gene reassortment during mixed infection with ts mutants of a cultivatable bovine rotavirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981 Jan;78(1):420-4. doi: 10.1073/pnas.78.1.420.

33. Chambers TJ, Nestorowicz A, Mason PW, Rice CM. Yellow fever/Japanese encephalitis chimeric viruses: construction and biological properties. *J Virol* 1999 Apr;73(4):3095-101. doi: 10.1128/JVI.73.4.3095-3101.1999.

34. Jackson RJ, Ramsay AJ, Christensen CD, Beaton S, Hall DF, Ramshaw IA. Expression of mouse interleukin-4 by a recombinant ectromelia virus suppresses cytolytic lymphocyte responses and overcomes genetic resistance to mousepox. *J Virol* 2001 Feb;75(3):1205-10. doi: 10.1128/JVI.75.3.1205-1210.2001. PMID: 11152493; PMCID: PMC114026.

35. Chen LM, Davis CT, Zhou H, Cox NJ, Donis RO. Genetic compatibility and virulence of reassortants derived from contemporary avian H5N1 and human H3N2 influenza A viruses. *PLoS Pathog* 2008 May 23;4(5):e1000072. doi: 10.1371/journal.ppat.1000072.

36. Menachery VD, Yount BL Jr, Debbink K, et al. A SARS-like cluster of circulating bat coronaviruses shows potential for human emergence. *Nature: Med* 2015 Dec;21(12):1508-13. doi: 10.1038/nm.3985.

37. Herfst S., Schrauwen E.J.A., Chutinimitkul S, et al. Why is HPAI H5N1 virus not transmissible via aerosol? An extensive mutational and phenotypic analysis of mutant and reassortant H5N1 viruses. – The Fourth ESWI Influenza Conference, 11-14 September 2011, Malta: Abstract book. – Malta: ESWI, 2011, p. 20.

38. Schweiger B, Reichel J, John K, Duwe SC. Generation of (multi)drug-resistant influenza A/H1N1 (2009) viruses by reassortment. – The Fourth ESWI Influenza Conference, 11-14 September 2011, Malta: Abstract book. – Malta: ESWI, 2011, p. 34

39. Kiseleva I, Dubrovina I, Bazhenova E. et al. Possible outcomes of reassortment in vivo between wild type and live attenuated influenza vaccine strains. – Ibid, p. 50.

40. Sonnberg S, Ducatez M, Peacey M. et al. Recovery of reassortant pandemic-seasonal H1N1 influenza viruses from a clinical specimen. – Ibid, p. 269

41. Noyce RS, Lederman S, Evans DH. Construction of an infectious horsepox virus vaccine from chemically synthesized DNA fragments. *PLoS One* 2018 Jan 19;13(1):e0188453. doi: 10.1371/journal.pone.0188453.

42. Chen DY, Kenney D, Chin CV, et al. Role of spike in the pathogenic and antigenic behavior of SARS-CoV-2 BA.1 Omicron. *bioRxiv* 2022 Oct 14:2022.10.13.512134.
doi: 10.1101/2022.10.13.512134. PMID: 36263066

43. Press Statement on the NSABB Review of H5N1 Research. – NIH, December 20, 2011;
https://www.nih.gov/news-events/news-releases/press-statement-nsabb-review-h5n1-research

44. Doing Diligence to Assess the Risks and Benefits of Life Sciences Gain-of-Function Research. – The White House, October 17, 2014: https://obamawhitehouse.archives.gov/blog/2014/10/17/doing-diligence-assess-risks-and-benefits-life-sciences-gain-function-research

45. Recommended Policy Guidance for Potential Pandemic Pathogen Care and Oversight. – The White House, January 9, 2017; https://obamawhitehouse.archives.gov/blog/2017/01/09/recommended-policy-guidance-potential-pandemic-pathogen-care-and-oversight

46. Deadly Germ Research Is Shut Down at Army Lab Over Safety Concerns. Problems with disposal of dangerous materials led the government to suspend research at the military's leading biodefense center. – *The New York Times*, August 5, 2019; https://www.nytimes.com/2019/08/05/health/germs-fort-detrick-biohazard.html

47. 'Medical Reporter'. Officials investigate how bird flu viruses were sent to unsuspecting labs. – *The Free Press/Canadian Press*; February 25, 2009; https://www.winnipegfreepress.com/arts-and-life/life/health/2009/02/25/officials-investigate-how-bird-flu-viruses-were-sent-to-unsuspecting-labs

48. Influenza (Flu): 1957-1958 Pandemic (H2N2 virus). – CDC, last reviewed: January 2, 2019; [цит. 20.11.22], доступно на сайте: https://www.cdc.gov/flu/pandemic-resources/1957-1958-pandemic.html

49. Schnirring L. Labs confirm same swine flu in deadly Mexican outbreaks. – CIDRAP, April24, 2009; [цит. 20.11.22], доступно на сайте: https://www.cidrap.umn.edu/news-perspective/2009/04/labs-confirm-same-swine-flu-deadly-mexican-outbreaks

50. Harrison NL, Sachs JD. A call for an independent inquiry into the origin of the SARS-CoV-2 virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2022, May 19, 119 (21) e2202769119; https://doi.org/10.1073/pnas.2202769119